Correlação entre imunodetecção, análise de DNA e espectrometria de massas na identificação de microcistinas em uma amostra real

Carolina C. Bueno (IC)[1], Maria Estela Silva-Stenico (PQ)[2], Tania Shishido (PG)[2], Ricardo Y. Honda (PG)[2], Marli F. Fiore (PQ)[2], Valdemar L. Tornisielo (PQ)[2], Augusto Etchegaray (PQ)[1,*]

[1]Faculdade de Química, CEATEC, PUC-Campinas, Rodovia D. Pedro I, Km 136, Parque das Universidades, CEP 13086-900, Campinas, SP; [2]CENA, USP, Avenida Centenário, 303, Caixa Postal 96, CEP 13.400-970, Piracicaba, SP. *e-mail: augusto.etchegaray@puc-campinas.edu.br

Palavras Chave: *peptídios não ribossômicos, cianobactérias, microcistinas, PCR*

Introdução

Microcistinas são peptídios cíclicos elaborados pela síntese não ribossômica de peptídios.[1] São produzidos em ambientes aquáticos eutrofizados onde ocorrem florações de cianobactérias tóxicas.[2] O objetivo deste trabalho é demonstrar a correlação entre métodos de detecção utilizados para avaliar a produção de microcistinas em um lago eutrofizado.

Resultados e Discussão

Após coleta, a amostra foi analisada para a presença de cianobactérias a partir da amplificação de seqüências específicas de DNA, imunodetecção e análise direta de extratos celulares por espectrometria de massas.[2] Foram identificadas pela observação em microscópio óptico a presença de cianobactérias dos gêneros *Microcystis* (*M. aeruginosa* e *M. panniformis*), *Radiocystis* sp., *Oscillatoria* sp., *Sphaerocavum* sp. (Figura 1).

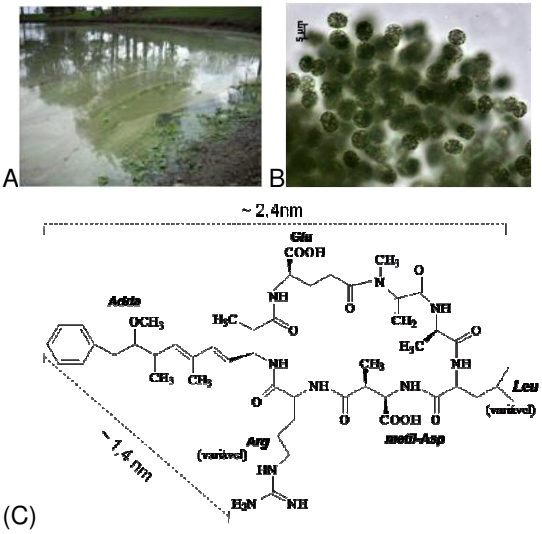

Figura 1. Identificação do local da coleta (A) e de uma das espécies de cianobactéria presente na amostra; *Radiocystis* sp. (B); estrutura da microcistina Leucina-Arginina – MLR – (C). Os aminoácidos L e R são variáveis.

A biossíntese de microcistinas e de outros peptídios não ribossômicos é feita com a participação de enzimas multifuncionais coletivamente chamadas de peptídio sintetases[1,3]. Genes codificadores destas sintetases podem ser identificados a partir da reação em cadeia da polimerase (PCR). O gene *MycE* codifica uma das sintetases de microcistinas.[3] Sua amplificação a partir da extração de DNA confirma a presença de cianobactérias produtoras de microcistinas na amostra. Entretanto, a presença deste gene não é indicativo da produção de microcistinas. Os genes precisam ser induzidos e as sintetases precisam sofrer modificação pós-tradução, recebendo o co-fator 4'-fosfo-panteteina.[1,3] Para confirmar a produção de microcistinas foram utilizados dois testes baseados na detecção imunoenzimática (ELISA e *Strip test*), utilizando anticorpos específicos para MLR. Adicionalmente, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, permite, a partir da fragmentação, identificar isoformas, normalmente presentes em matrizes ambientais.[2] A partir de extratos celulares, foi realizada análise em LC-MS/MS (Agilent 6410 MS), utilizando inserção direta. A análise permitiu a identificação das isoformas MLR e MRR. A Tabela 1 apresenta um resumo dos resultados encontrados.

Tabela 1. Correlação entre os métodos de detecção de microcistinas.

	*mcy*E	Elisa (ppb)	Strip (ppb)	MS (*m/z*)	isoforma
Amostra	+	> 1	> 1	995	MLR
				1010	MRR

Conclusões

Há uma correlação entre as técnicas empregadas. A espectrometria de massas apresentou resultados mais conclusivos, indicando a presença das isoformas MLR e MRR na amostra do lago.

Agradecimentos

À Fapesp e CNPq. A aluna CCB foi bolsista do CNPq (PIBIC) e também da FAPIC, Pró-Reitoria de pesquisas (PUC-Campinas).

[1] Etchegaray, A.; Silva-Stenico, M. E.; Moon, D. H.; Tsai, S. M. *Microbiol. Res.* **2004**, *159*, 425.
[2] Silva-Stenico, M. E.; Cantúsio-Neto, R.; Alves, I. R.; Moraes, L. A. B.; Shishido, T.; Fiore, M. F. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, 20, 535.
[3] Tillet, D.; Dittman, E.; Erhard, M.; von Döhren, H.; Börner, T.; Neilan, B. A. *Chem. Biol.* **2000**, 7, 753.